

PrimeScript™ Reverse Transcriptase

Code No. 2680Q
Size: 2,000 units

Shipping at – 20°C
Store at – 20°C

Supplied Reagents:
5X PrimeScript Buffer

500 µl

Lot No.

Concentration:

units/µl

Volume:

µl

Expiration Date:

Description

PrimeScript Reverse Transcriptase is a modified M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) RTase. This enzyme has extremely high extension capability and can synthesize long 1st-strand cDNA efficiently. Even for difficult templates, including RNAs with complex secondary structure, it is possible to synthesize 1st-strand cDNA at the normal reverse transcription temperature (42°C) with this enzyme. It is not necessary to perform the RT reaction at higher temperatures, a condition that may cause RNA degradation. This enzyme is suitable for preparation of long cDNAs, construction of cDNA libraries that include full-length cDNA, etc.

Storage buffer

20 mM	Tris-HCl, pH7.8
100 mM	NaCl
1 mM	EDTA
1 mM	DTT
50%	Glycerol (v/v)

Source

Purified from an *E. coli* strain expressing a recombinant enzyme.

Unit definition

One unit is the amount of the enzyme that incorporates 1 nmol of [³H] dTTP in 10 minutes at 37°C, with poly (rA) · oligo (dT)₁₂₋₁₈ as the primer-template.

Reaction mixture for unit definition:

50 mM	Tris-HCl, pH8.3
75 mM	KCl
8 mM	MgCl ₂
10 mM	DTT
20 µg/ml	(rA) _n · (dT) ₁₂₋₁₈
0.5 mM	[³ H] dTTP
0.1%	NP-40

1st-strand cDNA Synthesis Test

According to the standard protocol, 1st-strand cDNA was synthesized by incubating 100 ng of total RNA prepared from rat brain and 50 pmol of Oligo dT primer with 200 units of PrimeScript Reverse Transcriptase at 42°C for 60 minutes. Then, PCR was performed using the RT reactant as a template and amplification of a 12 kb target was confirmed by agarose gel electrophoresis.

Applications

1. First-strand cDNA synthesis.
2. Preparation of cDNA probes.
3. RT-PCR.

Purity

Nuclease activity is not detected in any of the following cases, as judged from the agarose gel electrophoresis pattern:

1. After incubation of 1 µg of λ-*Hind* III fragments with 200 units of this enzyme for 1 hour at 37°C.
2. After incubation of 1 µg of supercoiled pBR322 DNA with 200 units of this enzyme for 1 hour at 37°C.
3. After incubation of 1 µg of 16S and 23S rRNA with 200 units of this enzyme for 1 hour at 37°C.

Composition of Supplied Reagent

5X PrimeScript Buffer (for cDNA synthesis)	
250 mM	Tris-HCl, pH8.3
375 mM	KCl
15 mM	MgCl ₂

Standard protocol for 1st-strand cDNA synthesis

1. Prepare the following mixture in a microtube.

Oligo dT primer	50 pmol
(or random primer (6 mers)	50 pmol)
(or gene specific primer	2 pmol)
dNTP Mixture (10 mM each)	1 µl
Template RNA	total RNA ≤ 5 µg, mRNA ≤ 1 µg
RNase free dH ₂ O	up to 10 µl
2. Heat at 65°C for 5 min. and cool immediately on ice.
3. Prepare the reaction mixture by combining the following in a total volume of 20 µl.

Template RNA/Primer mixture	10 µl
5X PrimeScript Buffer	4 µl
RNase Inhibitor	20 units
PrimeScript Reverse Transcriptase	100 - 200 units *1
RNase free dH ₂ O	up to 20 µl

* 1: 100 units is recommended for RT-PCR and cDNA cloning; 200 units is recommended for quantitative analysis, such as qPCR.
4. Mix gently.
5. Perform the reaction under the following condition.

30°C	10 min. *1
42 (-50)°C *2	30 - 60 min. *3

* 1: This step is required for random primer.
* 2: It is generally recommended to perform the RT reaction at 42°C. However, for RT-PCR, if the reverse primer for PCR is also used as a RT primer, non-specific products may be amplified due to mispriming. In such a case, perform the RT reaction at 50°C for 30 min.
* 3: In most cases, 30 min. is sufficient. Increase the incubation time to 60 min. when the target is very long.
6. Heat at 70°C for 15 min. and cool on ice.

The obtained cDNA can be used for 2nd-strand cDNA synthesis or as a template for PCR.

Note

This product is for research use only. It is not intended for use in therapeutic or diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc. Takara products may not be resold or transferred, modified for resale or transfer, or used to manufacture commercial products without written approval from TAKARA BIO INC. If you require licenses for other use, please contact us by phone at +81 77 543 7247 or from our website at www.takara-bio.com. Your use of this product is also subject to compliance with any applicable licensing requirements described on the product web page. It is your responsibility to review, understand and adhere to any restrictions imposed by such statements. All trademarks are the property of their respective owners. Certain trademarks may not be registered in all jurisdictions.

PrimeScript® Reverse Transcriptase

Code No. 2680Q
Size: 2,000 units

Shipping at - 20°C
Store at - 20°C

添付試薬:

5 × PrimeScript Buffer

500 μl

Lot No. (英文面をご覧ください。)

濃度: (英文面をご覧ください。)

容量: (英文面をご覧ください。)

品質保証期限: (英文面をご覧ください。)

●製品説明

PrimeScript Reverse Transcriptase は、M-MLV (Moloney Murine Leukemia virus) 由来の Reverse Transcriptase をベースにしてタカラバイオが独自に開発した逆転写酵素である。本製品は伸長性に非常に優れ、長い cDNA が合成できる。また、GC リッチであるなど cDNA が合成しにくい構造の RNA に対しても、RNA が分解される恐れのある高温での反応を必要とせず、標準的な逆転写反応温度 (42°C) で効率よく cDNA 合成ができる。本酵素は、長い cDNA の調製や完全長 cDNA の割合が高いライブラリー作製に最適である。

●形状

20 mM	Tris-HCl, pH7.8
100 mM	NaCl
1 mM	EDTA
1 mM	DTT
50%	Glycerol (v/v)

●起源

組換え体大腸菌で発現、分離精製。

●活性の定義

Poly(rA)・oligo(dT)₁₂₋₁₈ を鋳型 / プライマーとし、37°C、10 分間に 1 nmol の [³H] dTTP を取り込む酵素活性を 1U とする。

●活性測定用反応液組成

50 mM	Tris-HCl, pH8.3
75 mM	KCl
8 mM	MgCl ₂
10 mM	DTT
20 μg/ml	(rA) _n ·(dT) ₁₂₋₁₈
0.5 mM	[³ H]dTTP
0.1%	NP-40

●1st-strand cDNA 合成試験

標準プロトコールに従って、ラット脳由来の total RNA 100 ng を鋳型とし、Oligo dT Primer 50 pmol および本酵素 200 units を用いて 42°C で 60 分間 1st-strand cDNA 合成反応を行った。続いてこの cDNA 反応液を鋳型として PCR を行い、アガロースゲル電気泳動によって 12 kb の増幅産物を確認した。

●用途

- 1st-strand cDNA 合成
- cDNA プロブ調製
- RT-PCR

●純度

- 200 U の本酵素と、1 μg の λ-Hind III 分解物とを 37°C、1 時間反応させても、DNA の電気泳動パターンに変化は起こらない。
- 200 U の本酵素と、1 μg の supercoiled pBR322 DNA とを 37°C、1 時間反応させても、DNA の電気泳動パターンに変化は起こらない。
- 200 U の本酵素と、1 μg の 23S および 16S rRNA 混合物とを 37°C、1 時間反応させても、RNA の電気泳動パターンに変化は起こらない。

●添付試薬組成 (保存: - 20°C)

5 × PrimeScript Buffer (cDNA 合成用)	
250 mM	Tris-HCl, pH8.3
375 mM	KCl
15 mM	MgCl ₂

●標準プロトコール

< 1st-strand cDNA 合成反応 >

- マイクロチューブ内で以下の液を混合する。

Oligo dT primer	50 pmol
(or Random primer (6 mers))	50 pmol)
(or Gene specific primer)	2 pmol)
dNTP mixture (10 mM each)	1 μl
鋳型 RNA total RNA : 5 μg 以下、mRNA : 1 μg 以下	
RNase free dH ₂ O	up to 10 μl

- 65°C で 5 分間保温した後、氷上で急冷する。

- 以下の反応液を加え、全量を 20 μl にする。

上記鋳型 RNA/Primer Mixture	10 μl
5 × PrimeScript Buffer	4 μl
RNase Inhibitor	20 units
PrimeScript Reverse Transcriptase	100 ~ 200 units
RNase free dH ₂ O	up to 20 μl

- 軽く攪拌する。

- 以下の条件で反応する。

30°C	10 min. * 1
42 (~ 50) °C * 2	30 ~ 60 min.

* 1: Random 6 mers を用いた場合に必要

* 2: PrimeScript Reverse Transcriptase は高次構造にも強い伸長性を示すので、通常の反応は 42°C を推奨する。RT-PCR において、PCR 下流プライマーを逆転写プライマーとして使用するとミスプライミングによる非特異的な増幅産物が生じる場合があるが、そのような場合には逆転写反応温度を 50°C にすることで改善が見られる。

- 70°C で 15 分間保温した後、氷上で冷却する。

得られた反応液は、PCR の鋳型として、あるいは 2nd-strand 合成反応に使用できる。

●注意

本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。ライセンスに関する最新の情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。本データシートに記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

v201311Da